

論文の内容の要旨

論文題目

Molecular basis of ligand recognition by cell surface proteins of higher eukaryotes
(高等真核生物における細胞表面タンパク質のリガンド認識の分子基盤)

氏名 森田 純子

多細胞生物は個体を構成する細胞間でシグナル分子による情報伝達を行う。その細胞表面のタンパク質が他者を認識する分子機構を理解することは、生命現象を理解する助けとなる。本研究では X 線結晶構造解析により、高等真核生物の細胞表面タンパク質がリガンドを認識する分子機構を解明することを目的とした。

コリンはヒトの必須栄養素であり、肝臓で血中の GPC (グリセロホスホコリン) が多段階的に加水分解されて作られ、体内に取り込まれる。ENPP6 は脊椎動物に保存された細胞外酵素であり、肝臓に高く発現する。生化学的には GPC などのコリン含有ホスホジエステルを加水分解し、ホスホコリンを産生する活性をもつ。これまで ENPP6 が生体内でのホスホコリン産生酵素であることが強く示唆されていたが、ENPP6 の構造情報は明らかになっておらず、そのコリン認識のメカニズムは不明であった。そこで本研究では、X 線結晶構造解析によって ENPP6 の立体構造を決定し、ENPP6 によるコリン認識メカニズムを解明することを試みた。ENPP6 を可溶性タンパク質として得るため、マウス由来 ENPP6 の触媒ドメイン領域にペプチドタグを付加し、HEK293T 細胞に分泌発現させ、ペプチドタグ特異的な抗体カラムとゲルろ過カラムにより精製した。マウス由来 ENPP6 で溶媒に露出すると予想される、配列中の種間保存性の低い 2 つのシステイン残基をそれぞれアラニン残基とセリン残基に置換した変異体 ENPP6 を作製することで、均質な単量体 ENPP6 を得ることに成功した。高純度に精製した ENPP6 と加水分解産物のホスホコリンとの共結晶を得て、結晶から X 線回折データを収集し、ENPP6-ホスホコリン複合体の結晶構造を 1.8 Å の分解能で決定した。

結晶構造でホスホコリンは ENPP6 の触媒部位に結合し、コリン部は 4 つのチロシン残基からなるコリン結合ポケットに囲まれていた。これらのチロシン残基をアラニン残基に置換した変異体

ENPP6 を精製し、GPC 加水分解活性を測定したところ、野生型の ENPP6 と比較し酵素活性が著しく低下した。この結果から、GPC のコリンは ENPP6 のコリン結合ポケットにより認識されることがわかった。さらに変異体 ENPP6 を培養細胞に過剰発現させ、変異体 ENPP6 により代謝されたコリンの細胞内への取り込みを測定した。その結果、コリン結合ポケットを変異させた ENPP6 を発現する培養細胞はコリン取り込み活性が低下することがわかった。構造解析と変異体の生化学的・細胞生物学的な機能解析により、ENPP6 が GPC のコリン構造を認識し切断することでホスホコリンを産生し、コリンを代謝する分子基盤が明らかになった。

動物や植物の個体は多くの細胞からなり、細胞間をホルモンが情報伝達することで個体の生理機能が制御される。植物では多くのホルモンがロイシンリッチリピート型受容体キナーゼ (Leucine-rich repeat receptor-like kinase: LRR-RK) に受容され、生長や分化・免疫応答などの生理現象を制御する。モデル植物シロイヌナズナでは 200 を超える数の LRR-RK が同定されており、いずれの LRR-RK も細胞外ドメインによってリガンドを認識し細胞内のキナーゼドメインを通じて下流に情報を伝える。CLE ペプチドは植物に保存されたペプチドホルモンファミリーであり、幹細胞の分化や増殖を制御する。CLE ペプチドである TDIF は LRR-RK である TDR によって受容され、前形成層細胞の細胞分裂と分化を制御する。CLE ペプチドを認識する LRR-RK の構造はこれまで明らかになっておらず、TDR による TDIF の認識機構は不明であった。そこで本研究では TDR の TDIF 認識機構を明らかにするため、TDR-TDIF 複合体の X 線結晶構造解析を行った。

シロイヌナズナ由来 TDR の細胞外ドメインに分泌シグナル配列を付加し、昆虫細胞発現系に分泌発現させた。高純度に精製した TDR に TDIF ペプチドを混合し共結晶化したが、構造解析に適した良質な結晶を得られなかった。そこで TDR 分子の糖鎖の構造的な不均一性が分子の規則的な結晶パッキングを妨げていることを疑い、精製 TDR に酵素処理を施し、糖鎖を切断した TDR を得た。しかしこれにより得られた結晶はまだ構造解析に十分な品質ではなかったため、さらに TDR 分子のリジン残基のメチル化反応を行った。この操作はタンパク質表面の性質を改善し、結晶化を促進することが知られる。この試料を用いて良質な結晶を得て、X 線回折データを収集し、TDR-TDIF 複合体の結晶構造を 3.0 Å の分解能で決定した。

結晶構造中で TDR の細胞外ドメインはらせん構造を形成し、その中央部に TDIF が結合していた。12 個のアミノ酸残基からなる TDIF は、6 番目のグリシン残基および 7 番目のヒドロキシプロリン残基の部分で折れ曲がり、TDR はこの折れ曲がりに沿うようポケット構造を作っていた。構造情報にもとづき生化学的解析、および植物の培養組織を使った解析を行い、TDIF との相互作用にかかわる TDR のアミノ酸残基を特定した。その結果、TDR は折れ曲がりを認識することで TDIF に結合することが明らかになった。これにより TDR による TDIF 認識機構が明らかになった。

TDIF の 6 番目のグリシン残基および 7 番目のヒドロキシプロリン残基は TDIF 以外の CLE ペプチドにおいても保存されているため、これらの CLE ペプチドも TDIF のように中央部で折れ曲がりを形成することが予想される。そのため CLE ペプチドを受容する LRR-RK はこれらの折れ曲がりを認識するために、TDR のもつようなポケット構造を共通してもつ可能性が示唆された。今回の発見により、CLE ペプチドが受容体によって認識される分子機構の理解が前進したといえる。